

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

D2

(11)Publication number : 2002-243734

(43)Date of publication of application : 28.08.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 35/08
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-037147

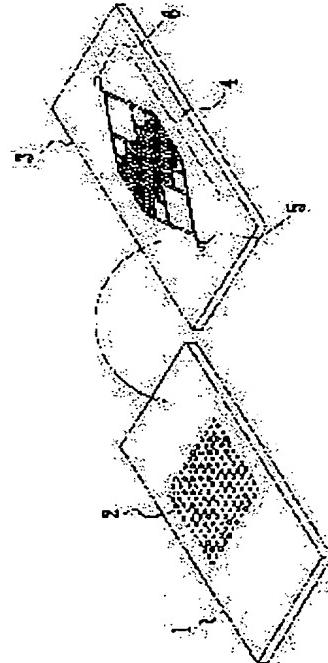
(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL
RES
ST RESEARCH KK

(22)Date of filing : 14.02.2001

(72)Inventor : YAMAGATA YUTAKA
INOUE KOZO**(54) MICROCHIP****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a biopolymer microchip having structure where a bonded compound is recovered to be identified after bonding between the compound and a protein or a DNA is detected on a microchip.

SOLUTION: In this microchip, a block is composed of the first and second substrates of which the flat faces are joined each other, a reaction field, a supply passage and a recovery passage are formed on a joining face between the substrates, and a supplying opening and a recovering opening are formed to communicate the supply passage and the recovery passage to the outside.



*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]A microchip provided with block characterized by comprising the following in which the system of reaction was formed.

A reaction field to which spot form or a strip was made to fix a biopolymer.

A feeding passage which is connected with this reaction field and supplies a sample to a reaction field, and a recovery passage which collects samples which connected with said reaction field and passed through at least a part of reaction field.

[Claim 2]In the microchip according to claim 1, said block is constituted by the 1st and 2nd substrates to which the flat surface of each other was joined, A microchip having formed said reaction field, a feeding passage, and a recovery passage in a plane of composition of these substrates, and forming an opening for supply and an opening for recovery which make said feeding passage and a recovery passage open for free passage to the exterior.

[Claim 3]A microchip, wherein immobilization of said biopolymer is performed by the electrospray deposition method in the microchip according to claim 1 or 2.

[Claim 4]A microchip, wherein an aforementioned feeding passage and a recovery passage are formed in two dimensions or in three dimensions in a microchip given in any 1 paragraph of claims 1-3.

[Claim 5]In a microchip of a statement, in any 1 paragraph of claims 1-4, said feeding passage or an opening for supply, A microchip characterized by what it has a feeding means which controls supply and a flow of said sample, and said recovery passage or an opening for recovery is provided with a recovery means which collects samples which passed through said reaction field for.

[Claim 6]A microchip given in any 1 paragraph of claims 1-5 characterized by comprising the following.

A feeding passage which said system of reaction is one in said opening side for supply, and branches by said reaction field side.

A reaction field which has two or more courses connected with every one each of this

branched feeding passage.

Two or more recovery passages connected with every one each of these courses.

Two or more openings for recovery which make every one each of these recovery passages open for free passage with the exterior.

[Claim 7]A microchip given in any 1 paragraph of claims 1-5 characterized by comprising the following.

A feeding passage which said system of reaction is one in said opening side for supply, and branches by said reaction field side.

A combining [have branched by said reaction field / which has two or more courses connected with every one each of this branched feeding passage /, and reaction field side, connect with every one each of these courses, and / with one]-by opening side for recovery recovery passage.

[Claim 8]A microchip given in any 1 paragraph of claims 1-5 characterized by comprising the following.

Said systems of reaction are two or more feeding passages.

Two or more openings for supply which make every one each of these feeding passages open for free passage with the exterior.

A reaction field which has two or more courses connected with every one each of said feeding passage.

Two or more openings for recovery which make every one each of two or more recovery passages connected with every one each of these courses, and these recovery passages open for free passage with the exterior.

[Claim 9]A microchip given in any 1 paragraph of claims 1-5 characterized by comprising the following.

Said systems of reaction are two or more feeding passages.

Two or more openings for supply which make every one each of these feeding passages open for free passage with the exterior.

A reaction field which has two or more courses connected with every one each of said feeding passage.

A combining [have branched by said reaction field side, connect with every one each of these courses, and / with one]-by opening side for recovery recovery passage.

[Claim 10]A microchip characterized by including ten or more of said system of reaction in 1-cm² in a microchip given in any 1 paragraph of claims 1-9.

[Claim 11]A microchip characterized by including 100 or more of said system of reaction in 1-cm² in a microchip given in any 1 paragraph of claims 1-9.

[Claim 12]A microchip characterized by including 1000 or more of said system of reaction in

1-cm² in a microchip given in any 1 paragraph of claims 1-8.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention]This invention relates to the microchip which consists of biopolymers, such as protein and nucleic acid (DNA), etc. More particularly, this invention relates to the micro reactor which carries out two or more owners of the system of reaction which used such a microchip.

[0002]

[Description of the Prior Art]The decipherment of the arrangement of a human genome is already completed by progress of human genome research. However, although the decipherment of a genome sequence is a very important result of life science, this is only the beginning of a still bigger technical problem. It is already moved to the functional break through of the protein in which the function of each gene produces the importance of the foundation and an application study, and the gene produces a jam. A break through of each gene expression mechanism is important similarly. use any -- for execution of such research, the art in which various sorts and a small amount of samples can be analyzed simultaneously is indispensable.

[0003]It was observed by microarray (chip) art as leading art which makes the purpose possible, and it is rapidly developed. The optical lithography method, the mechanical spotting method, the ink jet method, etc. are already put in practical use as microarray production art of DNA (Trends in Biotechnology, the 16 pages 301-306, and 1998). The method of attaining detection of combination with much protein and ligand simultaneously is also being developed. chip combined with mass spectrometry (Mass SpectrometryReviews, 16, and page 1-23, 1997). the Acrylamid Gel Pad method (Anal.Biochem., 278, the pages 123-131, and 2000). polyvinyliden difluoride film method (Anal.Biochem., 270, the pages 103-111, and 1999) The two-hybrid assay method (Nature, 403, the pages 623-627, and 2000) etc. -- it is . The electrospray deposition method (Anal.Chem. 71, the pages 3110-3117, and 1999) is indicated as a method applicable to both DNA and protein. On the other hand, the art of performing various chemical reactions on a microchip using a micro sample

is also studied for the various purpose, It is called "lab-on-chip", "integrated-chip", etc., and a part of art is already contained in the practical use stage (Pharmacia 36, the pages 34-38, and 2000; chemicals 54 (10) 14-19, 1999;; etc.).

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]In order to know a gene expression situation (quantity of production of mRNA), it is necessary to detect hybridization using labeled compounds, such as a fluorescent substance. Thereby, detection of combination and identification of a cementing material can be simultaneously performed on a DNA microchip. Both ligands combined with the protein, DNA, or it which makes it the purpose also in protein are known, and when the antibody to these can be used, detection and identification of the quality of an object can be simultaneously performed on a protein microchip by the usual methods, such as enzyme-labeling immunization and fluorescence immunization.

[0005]However, when one of protein and the compounds combined to it, or both functions and structures are strange, a separate means is required for the material identification combined with detection of combination. In order to identify the united substance, after detecting combination on a microchip, it is necessary to collect these compounds and to conduct various analysis. The same process is needed in also aiming a DNA microchip at a break through of a regulation-of-gene-expression factor etc.

[0006]Therefore, the purpose of this invention is to provide a biopolymer microchip with the structure where combination of much protein, or DNA and other compounds is detectable on a microchip, or the united compounds are collected and the identification can be performed.

[0007]Another purpose of this invention is to provide the micro reactor which makes a certain specific compound generate by a successive reaction from a certain starting compound by fixing a series of enzyme groups to each reaction field where it was connected mutually. In consideration of prevention of environmental pollution and climate warming or exhaustion of petrifaction resources, the conversion by the biochemistry method which uses conventional petroleum etc. as a raw material from an organic synthesis method is becoming an important technical problem. Under the present circumstances, it is dramatically important to establish the enzyme reaction system on a microchip for search of the optimal condition of a reaction, preparation of the sample of a scree NINGU stage, etc.

[0008]Other purposes of this invention are to provide the system which refines a very small quantity biopolymer etc. When carrying out separation refinement of the various compounds, such as protein, from a biological material, the quantity of the sample which can be treated is usually little very much. Such separation refinement is usually performed by electrophoresis and various chromatography. The way the electrophoresis can also already treat the sample of ultralow volume among such art is put in practical use. However, the chromatography art in which the sample of ultralow volume can be processed

is not yet developed. The meaning is large if chromatography art in which the sample of ultralow volume can be processed is put in practical use, since separation refinement art is indispensable in order to treat a compound. All the experiment processes are microfilmed dramatically and equipment, time, expense, time and effort, etc. can save substantially.

[0009]in order to attain the above purposes, without it spoils those functions for biopolymers, various organic compounds, etc., such as protein and DNA, on a substrate first -- certain -- reproducibility -- fixing highly is indispensable. It is desirable for the shape, the size, the number, and density of the fixed structure to be also changeable as much as possible if needed. The electrospray deposition method is satisfying these requirements as described by PCT international publication WO98/58745. therefore -- known protein and DNA, detection of combination between the ligand, and identification of a joint compound produce the antibody to these -- the enzyme-labeling immunization and the fluorescence immunization -- electrospray deposition (electrostatic atomization deposition) -- it can carry out simultaneously on the microchip produced by law.

[0010]becoming on the other hand future very important -- a function -- it is recommending a break through of unknown protein. Just it is not enough even if the gene which is a gene level is presumed to have played the role which is in the living body. It is required to clarify the proteinic function in which the code is carried out by the gene to the last. Therefore, various approaches are proposed. For example, the substructure of an active center etc. is clarified by NMR (nuclear magnetic resonance apparatus), and there is a method of presuming the function based on the similarity to known protein. However, if the fact in the living body that a reaction is performed with protein and the reaction is altogether started by combination with ligand is taken into consideration, first -- a function -- it cannot be overemphasized that it is a method [direct / functional / the most important for a functional break through of unknown protein and] to clarify structure of the compound which found the substance combined with unknown protein and was subsequently combined.

[0011]Therefore, it is detected whether a certain protein and the examined compound joined together first on the protein microchip fixed by the electrospray deposition method. This detection chooses the optimal method suitably with the combination of protein and a compound. If there is a compound in which combination was checked, these compounds will be dissociated and collected from protein and that structure will be determined with various analysis methods. It is the purpose of this invention to indicate the microchip (namely, micro reactor) which attains such a function. What is necessary is to fix an enzyme group required for micro reactor production to a position, and just to connect mutually. For minute amount refining, the chromatography of a different type is producible by fixing the substance specifically combined with an object compound, or the substance used for various chromatographies usual [other]. At this time, the shape of the structure fixed can also be suitably chosen according to the purpose. It is also possible by in a certain case, fixing to the whole channel or changing the conditions of electrospray deposition to give porosity.

[0012]

[Means for Solving the Problem]A reaction field to which a microchip by this invention made spot form or a strip fix a biopolymer, It has a block in which the system of reaction which has a feeding passage which is connected with this reaction field and supplies a sample to a reaction field, and a recovery passage which collects samples which connected with said reaction field and passed through at least a part of reaction field was formed. According to this composition, using minute amount biopolymer and sample, combination with a biopolymer and a sample is detectable on a microchip, or united compounds can be collected and the identification can be performed.

[0013]A microchip by this invention constitutes said block by the 1st and 2nd substrates to which the flat surface of each other was joined, Said reaction field, a feeding passage, and a recovery passage were formed in a plane of composition of these substrates, and an opening for supply and an opening for recovery which make said feeding passage and a recovery passage open for free passage to the exterior were formed. According to this composition, a microchip is easily producible by a simple manufacturing process of sticking the 2nd plate into which a crevice used as a fine channel was processed, for example, and the 1st substrate to which a biopolymer was made fixing.

[0014]As for a microchip by this invention, in the microchip according to claim 1 or 2, immobilization of said biopolymer is performed by the electrospray deposition method. According to the electrospray deposition method, a spot can be produced, without spoiling biological functions of a biopolymer.

[0015]As for a microchip by this invention, an aforementioned feeding passage and a recovery passage are formed in two dimensions or in three dimensions. According to this composition, it is also possible by constituting a channel in three dimensions to collect individually fluids which reacted at an individual biopolymer spot. The system of reaction of 1 input multi-output, multi input 1 output, and a multi input multi-output is easily producible. That is, if arrangement of a spot has a margin when supplying a sample to a spot (reaction field) in two dimensions (flat surface), it can respond, but a place in which each channel is established will run short of spots densely arranged at a flat surface at array form. Then, a penetrated part is provided, for example in the 1st substrate and 2nd substrate in three dimensions (solid), and if a sample is supplied from the upper part or a lower part or reactants are collected, even if it is dense spot arrangement, each channel can be arranged easily.

[0016]A microchip by this invention is provided with a feeding means by which said feeding passage or an opening for supply controls supply and a flow of said sample, and said recovery passage or an opening for recovery is provided with a recovery means which collects samples which passed through said reaction field. According to the control means of this composition, a flow of a sample can be adjusted with the characteristic of a reaction. A reactant is easily recoverable by a recovery means.

[0017]A microchip by this invention is provided with the following.

A feeding passage which said system of reaction is one in said opening side for supply, and branches by said reaction field side.

A reaction field which has two or more courses connected with every one each of this branched feeding passage.

Two or more openings for recovery which make every one each of two or more recovery passages connected with every one each of these courses, and these recovery passages open for free passage with the exterior.

[0018]A microchip by this invention is provided with the following.

A feeding passage which said system of reaction is one in said opening side for supply, and branches by said reaction field side.

A reaction field which has two or more courses connected with every one each of this branched feeding passage.

Combining [have branched by said reaction field side, connect with every one each of these courses, and / with one]-by opening side for recovery recovery passage.

[0019]A microchip by this invention is provided with the following.

Said systems of reaction are two or more feeding passages.

Two or more openings for supply which make every one each of these feeding passages open for free passage with the exterior.

Two or more openings for recovery which make every one each of a reaction field which has two or more courses connected with every one each of said feeding passage, two or more recovery passages connected with every one each of these courses, and these recovery passages open for free passage with the exterior.

[0020]A microchip by this invention is provided with the following.

Said systems of reaction are two or more feeding passages.

Two or more openings for supply which make every one each of these feeding passages open for free passage with the exterior.

Combining [have branched by said reaction field / which has two or more courses connected with every one each of said feeding passage /, and reaction field side, connect with every one each of these courses, and / with one]-by opening side for recovery recovery passage.

[0021]If the various systems of reaction are constituted like 1 input multi-output, 1 input multi-reaction path 1 output, multi input 1 output, and a multi input multi-output as mentioned above, correspondence will become possible flexibly for arrangement of various spots, or a desired reaction. For example, if it is considered as 1 input multi-output, reactants can be individually collected for every spot. If it is considered as a multi input multi-output, a sample of various sorts can be supplied by one operation, the system of

reaction which has many reaction paths can be constituted, and reactants can be collected for every sample.

[0022]In this invention, a fixed place of a biopolymer is arbitrary. For example, spot form can also be made to fix to the surface of the 1st substrate. Or the whole can also be made to fix to a wall of a reaction field, according to such composition, it becomes large about a touch area of a biopolymer and a sample, and reaction efficiency can be raised.

[0023]A microchip by this invention is characterized for said system of reaction by ten or more pieces, 100 pieces or more, or including 1000 or more pieces at 1-cm². According to this composition, since the system of reaction is microfilmed, the system of reaction can be constituted from a minute amount sample, and many steps of reactions can be performed by one operation on one field where a chip is small.

[0024]

[Embodiment of the Invention]Hereafter, based on an attached drawing, the embodiment of this invention is explained in detail. The spot at which the microchip by this invention fixed a biopolymeric material or the charges of an organic high polymer material, such as protein, by the electrospray deposition method, It comprises a board part which supports it, a fine channel portion which supplies a fluid there further, and a fine channel portion which collects reactants.

[0025]Drawing 1 is an exploded view of the microchip by this invention, and shows the fundamental example of composition of a microchip. The substrate 1 in a figure is constituted by plastics (PMMA, polycarbonate, polyethylene, fluororesin, etc.), glass (silica glass, optical glass, etc.), ceramics (an aluminum oxide, zirconium oxide, silicon nitride, aluminum nitride, etc.), or metal. When electric insulation is a good substrate, it is also possible to give conductive thin films (gold, platina **ITO, etc.) to the surface.

[0026]The spot 2 of a biopolymer is formed by the electrospray deposition (ESD) method at array form on this 1st substrate 1 (glass or product made from a plastic). These spots 2 are formed by the ESD method in accordance with the techniques of microarray production currently opened to the pages 3110-3117 (1999) of Anal.Chem. 71, and are fixed after that by processing by cross linking agents (glutaraldehyde etc.). as the material of the polymers which form a spot -- various protein (an enzyme.) If it is high-performance material which it is made to polymerize by cross linking agents, such as charges of an organic high polymer material (an acrylic resin, cellulose, ion-exchange resin, epoxy resin), such as an antibody and membrane protein, and coloring matter, and can be fixed, it is usable in almost all things.

[0027]The crevice 4 is established in one side of the 2nd substrate 3, by joining the crevice 4 side of the 2nd substrate 3 the spot dimorphism Shigeru side of the 1st substrate 1, the closed fine channel and reaction field are formed, and the fluid which should react is supplied appropriately. The penetrated part is provided in the end of the crevice 4 of the 2nd substrate 3, respectively, and it is used for it as the opening 5 for supply, and the opening 6 for recovery, respectively. The fluid which flowed from the opening 5 for supply

flows into a fine channel, and after carrying out branch separation, a fluid's flowing into all the spot portions uniformly in parallel and this channel's passing a spot portion, it converges as one channel eventually and is designed discharge from the opening 6 for recovery. That is, the system of reaction of 1 input multi-output is formed.

[0028]Next, the structure of the substrate 1 to which the polymers spot was made to fix is explained in detail. Drawing 2 shows the composition of the spot 2 of the biopolymer formed on the substrate 1. The spot 2 is formed in the diameter 10 - the size of about 100 microns of numbers, and the thickness is about 1-50 microns. The interval of each spot is about 1 to 10 times of the diameter. The number of a spot is possible in the range from some to about tens of thousands of pieces, and it is also possible to comprise the biopolymer or organic high polymer in which the whole of each spot differs, and to fix the same kind of polymers for every sequence. Of course, it is also possible to constitute all the spots from same polymers. Although the shape of a spot is circular by a diagram, it is also possible to form the spot of a rectangle, a square, and other shape.

[0029]Next, the structure of the 2nd substrate 3 where the crevice 4 in which a fine channel is made to form was formed is explained in detail. Drawing 3 is a mimetic diagram of a fine channel with 1 input 1 output. Reaction mixture is poured in by the pump, syringe, or pipette connected to the opening 5 for supply, is distributed uniformly in the fluid distribution circuit 7, and flows into each reaction flow paths (reaction field) 8. The reaction flow paths 8 are formed so that a biopolymer spot (not shown) may be arranged, and prehension of the quality of an object, reaction, analysis, and detection are performed by the reaction of a biopolymer and a fluid.. The fluid which came out of the reaction flow paths 8 is led to the opening 6 for recovery through the set circuit 9. A fluid is discharged and recovered by the tube or pump connected to the opening 6 for recovery.

[0030]Drawing 4 shows the section structure of the microchip equipped with the 2nd substrate 3 to the 1st substrate 1. On the substrate 1, the biopolymer spot 2 fixed by the electrospray method is separated by the slot of the fine channel structure formed of the crevice 4 of the 1st substrate 1 and the 2nd substrate 3, respectively, and a fluid flows on the spot 2.

[0031]Next, the manufacturing method of a fine channel structure, i.e., the method of producing the crevice 4 on the 2nd substrate 3, is explained. The 2nd substrate 3 is constituted by plastics (PMMA, polycarbonate, polypropylene, polyethylene, etc.), glass (optical glass, silica glass, sapphire glass, etc.), ceramics (alumina, zirconia, silicon nitride, etc.), or the metallic material. As a method of forming the detailed grooved crevice 4 directly, How to shave off a part for a slot by cutting with detailed cutting tools (an end mill, a byte, etc.), and form, The method of forming the mask by photoresist and forming by chemical etching, the method of forming a mask by photoresist and forming with an abrasive jet, the method of forming the crevice 4 by an electron discharge method, etc. are possible. How to back-calcinate injection-molding Perilla frutescens (L.) Britton var. crispa (Thunb.) Decne. for the method, ceramics, or metallic slurry which forms a mold as a

method of improving mass production nature using the technique of forming the aforementioned minute groove directly, and performs injection molding by a plastic using this etc. are possible. It is also possible to carry out the press mold of the glass material at an elevated temperature by using refractory materials, such as tungsten carbide, as die materials, and to form the crevice 4.

[0032] Next, junction of the 1st substrate 1 and the 2nd substrate 3 that is fine channel structures is explained. Although it is common to apply adhesives etc. thinly and to perform them as for the junction to the 2nd substrate 3 that is a fine channel structure, and the 1st substrate 1 that supports a biopolymer spot, How to join without using adhesives by making both flatness very high besides this (the optical contact method), It may join by the method of activating the surface chemically and joining, the methods (diffusion bonding technique etc.) of raising temperature and joining, the method of adding supersonic vibration and joining, the method of performing by completing energy beams, such as a laser beam, as an interface, etc.

[0033] Drawing 5 is a mimetic diagram of the fine channel of 1 input multi-output (and parallel reaction field). From the inlet 10, reaction fluid is poured in with a pump etc., is uniformly distributed by the fluid distribution passage part 11, and flows into the reaction flow paths 12. The fluid which flowed passes through the biopolymer chip top which exists in the reaction flow paths 12, and reaches to the collection port 14 which became independent through the recovery passage 13, respectively. A pump or a pipette recovers the fluid after a reaction from each opening 14 for recovery.

[0034] Drawing 6 is a mimetic diagram of the fine channel of a consecutive reaction system. The fluid which serves as a sample from the opening 10 for supply is poured in, two or more polymers spots are arranged in the middle of the channel, a fluid passes through these spot top (namely, reaction flow paths 12) one by one according to a fine channel, and it is collected from the opening 14 for recovery. In this case, a big reaction surface product can be obtained by considering it as a rectangle, as [a polymers spot does not necessarily need to be circular and] shown in a figure. Reaction mixture is supplied by the pump or a pipette from the inlet 10, and is collected from the outlet 14 through the reaction flow paths 12. It is possible to make it react to many spots efficiently on the system of a narrow area by making the channel which forms the reaction flow paths 12 wind like drawing 6.

[0035] Drawing 7 is the mimetic diagram and A-A' sectional view of a micro column which were formed by the polymers spot fixed by the electrospray method. Although this constitutes a fine channel like the microchip system shown in drawing 1, in order that it may make the crevice 16 used as a fine channel have formed in the 1st substrate 15 the very thing and may make a reaction surface product large, it forms the coat 17 of polymers in a fine channel by the electrospray method. And a fine channel is made to form by piling up the 2nd flat substrate 18 on this 1st substrate 15. As for crevice 16 portion of the 1st substrate 15, the wall inclines and a polymers coat adheres easily by electrospray. Thereby, a fluid can increase the area in contact with a polymers coat in a channel. The

fine channel is arranged at mesh shape and the reaction flow paths 19 can take a very large reaction surface product. It is usable in protein with the specific adsorption capacity used for AFUNI tee chromatographs, such as an antibody and protein-A, as a polymer material, and the charge of an organic high polymer material. It is [network structure / of a reaction part] usable in various patterns besides a graphic display. Thus, although the 1st base 15 with the crevice 16 which fixed the polymers coat, and the 2nd flat substrate 18 without a polymers spot are joined in drawing 7, it is also possible to enlarge a reaction surface product more by joining substrate 15 comrades with the crevice 16 which fixed this polymers coat.

[0036]It is also possible by constituting a channel in three dimensions to collect individually the fluids which reacted at the individual biopolymer spot. Drawing 8 shows the example of composition of a microchip system with the three-dimensional channel which consists of five layer systems including a substrate. the 1st which is a substrate -- layer 21 and the 2nd -- layer 22 and the 3rd -- layer 23 and the 4th -- layer 24 -- 25 [layer / 5th] is piled up one by one. The 1st layer of the spot 21A of the biopolymer is fixed to 21. The 2nd layer of the penetrated part is provided in the position corresponding to each spot in 22, and this portion functions as the reaction flow paths (place) 22A. the 5th layer of reaction fluid flowing from the input 25A of the left of 25, and letting the 4th layer of the distribution channel 24A of 24 pass -- each polymers spot upper part -- the 3rd layer is given to the fine hole 23A for fluid supplies of 23. It passes through the upper part of the polymers spot 21A which flowed into the reaction flow paths 22A of 22 the 2nd layer after that, and was formed in 21 the 1st layer, and a reaction is performed. the fluid which the reaction broke -- again -- the 3rd -- the fine hole for reactant recovery of layer 23 -- and it passes along the fine hole 24B for reactant recovery of 24 the 4th layer, and the 5th layer reaches the collection port 25B of 25. A fluid is individually recovered by a pipette or the pump by the collection port 25B.

[0037]The example quoted in the above-mentioned embodiment is only illustration, and please care about that many modification and the example of change are included in the range of this invention.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]It is an exploded view of the microchip by this invention.

[Drawing 2]It is a figure showing the composition of the spot 2 of the biopolymer formed on the substrate 1.

[Drawing 3]It is a mimetic diagram of a fine channel with 1 input 1 output.

[Drawing 4]It is a figure showing the section structure of the microchip equipped with the plate 3 in the substrate 1.

[Drawing 5]It is a mimetic diagram of the fine channel of 1 input multi-output.

[Drawing 6]It is a mimetic diagram of the fine channel of a consecutive reaction system.

[Drawing 7]It is the mimetic diagram and A-A' sectional view of a micro column which were formed by the polymers spot fixed by the electrospray method.

[Drawing 8]It is a figure showing the example of composition of a microchip system with the three-dimensional channel which consists of five layer systems also including a substrate.

[Description of Notations]

1 The 1st substrate

2 Spot

3 The 2nd substrate

4 Crevice

5 The opening for supply

6 The opening for recovery

7 Fluid distribution channel

8 Reaction flow paths (reaction field)

9 Set channel

10 The opening for supply

11 Fluid distribution passage part

12 Reaction flow paths

13 Recovery passage

14 The opening for recovery

15 The 1st substrate
16 Crevise 16
17 The coat of polymers
18 The 2nd substrate
19 Reaction flow paths
21 The 1st layer
21A spot
22 The 2nd layer
22A reaction flow paths (place)
23 The 3rd layer
The fine hole for 23A fluid supplies
The fine hole for 23B reactant recovery
24 The 4th layer
24A distribution channel
The fine hole for 24B reactant recovery
25 The 5th layer
25A input
25B collection port

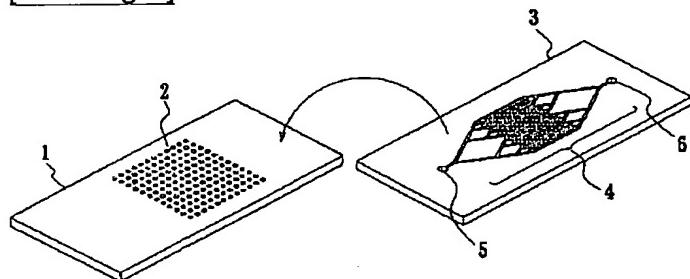
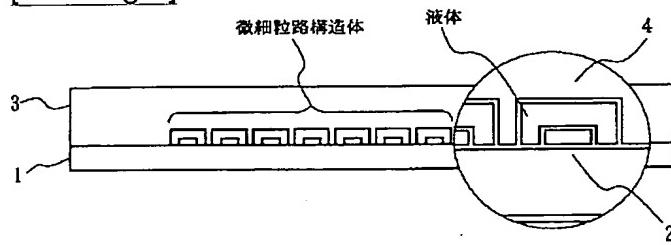
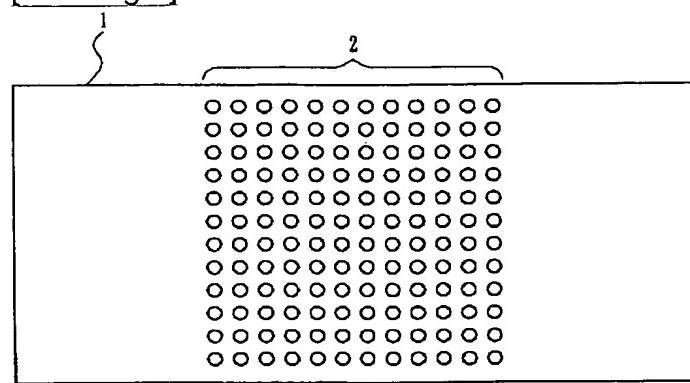
[Translation done.]

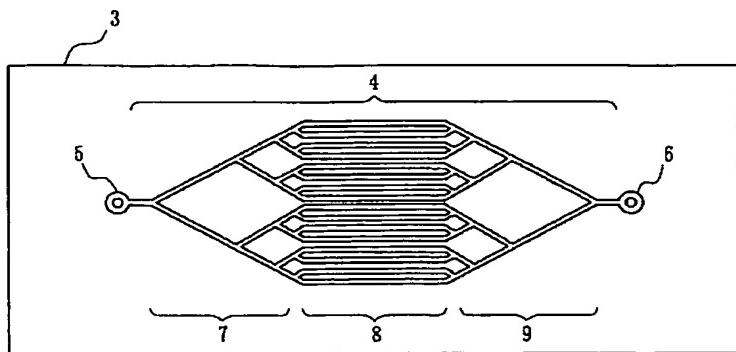
*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

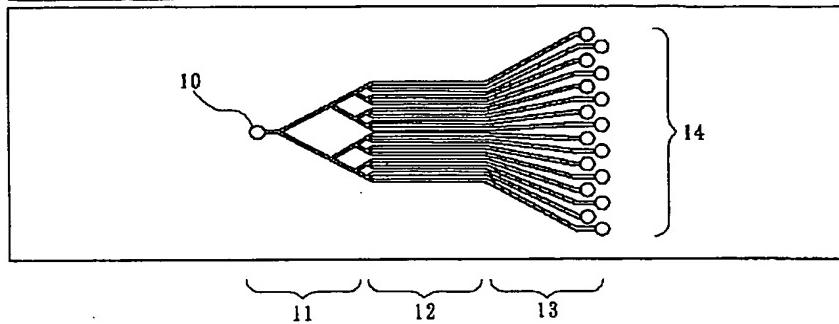
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

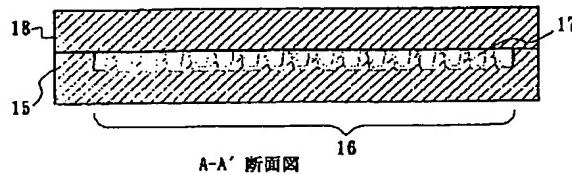
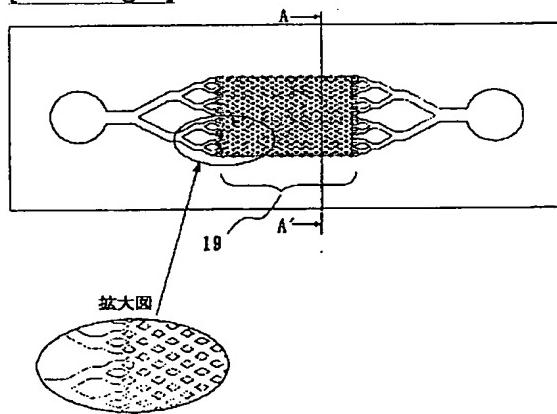
[Drawing 1]**[Drawing 4]****[Drawing 2]****[Drawing 3]**



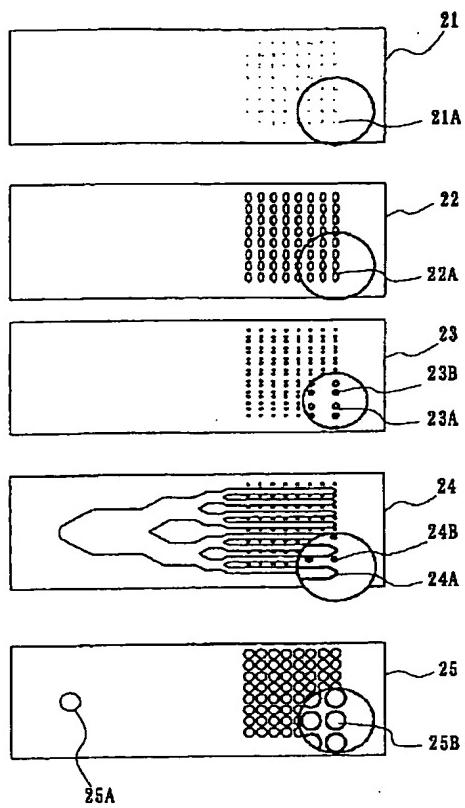
[Drawing 5]



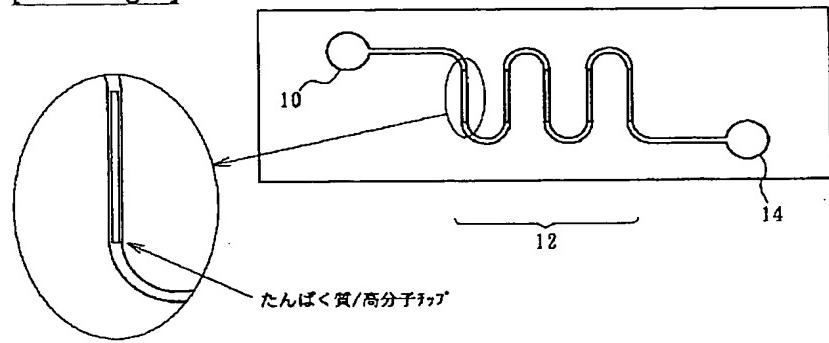
[Drawing 7]



[Drawing 8]



[Drawing 6]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-243734
(P2002-243734A)

(43) 公開日 平成14年8月28日 (2002.8.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 5 8
33/566		33/566	
35/08		35/08	A
37/00	1 0 1	37/00	1 0 1

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全9頁)

(21) 出願番号 特願2001-37147(P2001-37147)
 (22) 出願日 平成13年2月14日 (2001.2.14)

(71) 出願人 000006792
 理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号
 (71) 出願人 399014875
 エス・ティ・リサーチ株式会社
 東京都渋谷区広尾1-11-5-1403
 (72) 発明者 山形 豊
 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
 内
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作 (外1名)

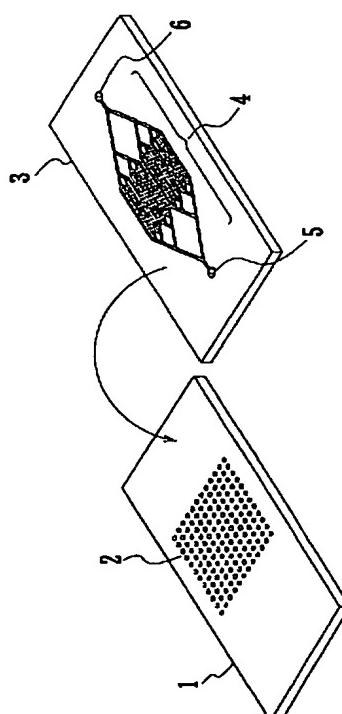
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロチップ

(57) 【要約】

【課題】 蛋白質やDNAと他の化合物との結合の検出をマイクロチップ上で行った後、結合した化合物を回収しその同定を行えるような構造を持つ生体高分子マイクロチップを提供する。

【解決手段】 ブロックを、平坦な表面を互いに接合させた第1及び第2の基板を以って構成し、反応場、供給流路及び回収流路をこれらの基板の接合面に形成し、供給流路および回収流路を外部へ連通させる供給用開口及び回収用開口を形成したことを特徴とするマイクロチップを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体高分子をスポット状またはストリップ状に固定させた反応場と、この反応場に連結され、反応場へ試料を供給する供給流路と、

前記反応場と連結し、反応場の少なくとも一部を通過した試料を回収する回収流路と、を有する反応系を形成したブロックを具えることを特徴とするマイクロチップ。

【請求項2】 請求項1に記載のマイクロチップにおいて、

前記ブロックを、平坦な表面を互いに接合させた第1及び第2の基板を以って構成し、前記反応場、供給流路及び回収流路をこれらの基板の接合面に形成し、前記供給流路および回収流路を外部へ連通させる供給用開口及び回収用開口を形成したことを特徴とするマイクロチップ。

【請求項3】 請求項1または2に記載のマイクロチップにおいて、

前記生体高分子の固定が、エレクトロスプレイ・デポジション法によって行われることを特徴とするマイクロチップ。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記の供給流路及び回収流路は、2次元的または3次元的に形成されていることを特徴とするマイクロチップ。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、前記供給流路または供給用開口が、前記試料の供給及び流量を制御する供給手段を具え、

前記回収流路または回収用開口が、前記反応場を通過した試料を回収する回収手段を具える、ことを特徴とするマイクロチップ。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系が、前記供給用開口側では1つになっており、前記反応場側で分岐される供給流路と、この分岐された供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有する反応場と、これらの経路の各々に1つずつ連結される複数の回収流路と、を有することを特徴とするマイクロチップ。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系が、前記供給用開口側では1つになっており、前記反応場側で分岐される供給流路と、この分岐された供給流路の各々に1つずつ連結される複

数の経路を有する反応場と、

前記反応場側で分岐しており、これらの経路の各々に1つずつ連結され、回収用開口側で1つに結合されている回収流路と、を有することを特徴とするマイクロチップ。

【請求項8】 請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系が、

複数の供給流路と、

これらの供給流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の供給用開口と、

前記供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有する反応場と、

これらの経路の各々に1つずつ連結される複数の回収流路と、

これらの回収流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の回収用開口と、を有することを特徴とするマイクロチップ。

【請求項9】 請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系が、

複数の供給流路と、

これらの供給流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の供給用開口と、

前記供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有する反応場と、

前記反応場側で分岐しており、これらの経路の各々に1つずつ連結され、回収用開口側で1つに結合されている回収流路と、を有することを特徴とするマイクロチップ。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系を 1 cm^2 に10ヶ以上含む事を特徴とするマイクロチップ。

【請求項11】 請求項1～9のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系を 1 cm^2 に100ヶ以上含む事を特徴とするマイクロチップ。

【請求項12】 請求項1～8のいずれか1項に記載のマイクロチップにおいて、

前記反応系を 1 cm^2 に1000ヶ以上含む事を特徴とするマイクロチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は蛋白質・核酸(DNA)などの生体高分子等からなるマイクロチップに関するものである。更に詳細には、本発明はこのようなマイクロチップを用いた反応系を複数有するマイクロリアクタに関するものである。

【0002】

【従来の技術】ヒトゲノム研究の進展により、既にヒトゲノムの配列の解読は完了されている。しかし、ゲノム配列の解読は生命科学の極めて重要な成果ではあるが、これは更に大きな課題の始まりに過ぎない。既に基礎・応用研究の重点は、個々の遺伝子の機能、つまりはその遺伝子の生産する蛋白質の機能解明に移されている。又、個々の遺伝子発現機構の解明も同じ様に重要である。何れにしろ、このような研究の遂行のためには、多種類かつ微量の試料を同時に分析できる技術が必須である。

【0003】その目的を可能にする有力な技術として注目され急激に発展しているのが、マイクロアレイ（チップ）技術である。DNAのマイクロアレイ作製技術として既に、光リソグラフィー法・メカニカルスポットティング法・インクジェット法等が実用化されている（Trends in Biotechnology, 16, ページ301～306, 1998年）。また、同時に多数の蛋白質とリガンドとの結合の検出を達成しようとする方法も開発されつつある。質量分析法と組み合わせたチップ（Mass Spectrometry Reviews, 16, ページ1～23, 1997年）、Acrylamid Gel Pad法（Anal. Biochem., 278, ページ123～131, 2000年）、polyvinylidene difluoride膜法（Anal. Biochem., 270, ページ103～111, 1999年）、two-hybrid assay法（Nature, 403, ページ623～627, 2000年）等である。また、DNA・蛋白質のどちらにも適用できる方法として、エレクトロスプレイ・デポジション法（Anal. Chem. 71, ページ3110～3117, 1999年）が開示されている。一方、微量試料を用いて種々の化学反応をマイクロチップ上で行う技術も種々の目的で研究され、“lab-on-chip”, “integrated-chip”などと呼ばれており、既に一部の技術は実用段階に入っている（ファルマシア36, ページ34～38, 2000年；化学 54 (10) 14-19, 1999年；など）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】遺伝子の発現状況（mRNAの生産量）を知るためにには、蛍光物質などの標識化合物を用いハイブリダイゼーションを検出する必要がある。これにより、DNAマイクロチップ上で結合の検出と結合物質の同定を行なうことができる。また、蛋白質の場合も、目的とする蛋白質やDNA或いはそれに結合するリガンドの両方が既知でありこれらへの抗体が利用できる場合には、酵素標識免疫法や蛍光免疫法などの通常の方法で、蛋白質マイクロチップ上で目的物質の検出と同定を行なうことができる。

【0005】しかし、蛋白質とそれへ結合する化合物のどちらか或いは両方の機能や構造が未知の場合、結合の検出と結合した物質の同定には、別々の手段が必要である。結合した物質を同定するためには、マイクロチップ上で結合を検出した後この化合物を回収し種々の分析を行う必要がある。DNAマイクロチップも、遺伝子発現

調節因子などの解明を目的とする場合には、同様なプロセスが必要となる。

【0006】従って、本発明の目的は、多数の蛋白質やDNAと他の化合物の結合の検出をマイクロチップ上で行ったり、結合した化合物を回収しその同定を行えるような構造を持つ生体高分子マイクロチップを提供することである。

【0007】また、本発明の別の目的は、一連の酵素群を相互に連結された各反応場に固定する事により、ある出発化合物からある特定の化合物を連続反応により生成させる、マイクロリアクタを提供する事である。環境汚染・気候温暖化の防止や石化資源の枯渇を考慮し、従来の石油などを原料とする有機合成法から生化学法への変換が重要な課題になりつつある。この際、反応の最適条件の検索やスクリーニング段階の試料の調製等のために、マイクロチップ上での酵素反応系を確立する事は非常に重要である。

【0008】更に、本発明の他の目的は、微量な生体高分子などを精製するシステムを提供する事である。生体試料から蛋白質などの各種化合物を分離精製する時、扱える試料の量は通常極めて微量である。このような分離精製は通常、電気泳動や種々のクロマトグラフィによって行われる。これらの技術のうち、電気泳動は既に極微量の試料でも扱える方法が実用化されている。ところが、極微量の試料を処理できるクロマトグラフィ技術は未だ開発されていない。分離精製技術は化合物を扱うために必須であるため、極微量の試料を処理できるクロマトグラフィ技術が実用化されれば、その意義は大きい。全ての実験プロセスが非常にマイクロ化され、設備・時間・費用・手間などが大幅に節約できる。

【0009】上述のような目的を達成するためには、先ず蛋白質やDNAなどの生体高分子や各種有機化合物等を基板上にそれらの機能を損なう事なく確実に再現性高く固定化することが必須である。また、その固定化された構造体の形状・大きさ・数・密度も必要に応じ、可能な限り変えることが出来ることが望ましい。PCT国際公開WO98/58745に記述されているように、エレクトロスプレイ・デポジション法はこれらの要件を満たしている。従って、既知の蛋白質・DNAとそのリガンド間の結合の検出と結合化合物の同定は、これらへの抗体を作製し酵素標識免疫法や蛍光免疫法により、エレクトロスプレイ・デポジション（静電噴霧堆積）法で作製したマイクロチップ上で同時に行える。

【0010】一方、今後非常に重要なのが、機能不明の蛋白質の解明をすすめることである。遺伝子レベルである遺伝子が生体内である役割をはたしていると推定されても、それだけでは十分ではない。あくまでも、その遺伝子によりコードされている蛋白質の機能を明らかにすることが必要である。その為に、種々のアプローチが提案されている。例えば、NMR（核磁気共鳴装置）

により活性中心などの部分構造を明らかにし、既知の蛋白質との類似性に基づきその機能を推定する、という方法がある。しかし、生体内の全て反応は蛋白質により実行され、その反応はリガンドとの結合により開始されるという事実を考慮すれば、先ず機能不明の蛋白質と結合する物質を見つけ、次いで結合した化合物の構造を明らかにしていくことが、機能不明の蛋白質の機能解明のためには最も重要かつ直接的方法であることはいうまでもない。

【0011】そのために、先ず、エレクトロスプレイ・デポジション法で固定された蛋白質マイクロチップ上で、ある蛋白質と試験された化合物が結合したかどうかを検出する。この検出は、蛋白質と化合物の組み合わせにより、適宜最適の方法を選択する。結合が確認された化合物があれば、この化合物を蛋白質から解離・回収し、種々の分析法によりその構造を決定する。このような機能を達成するマイクロチップ（即ちマイクロリアクタ）を開示するのが本発明の目的である。また、マイクロリアクタ作製のためには、必要な酵素群を所定の位置に固定し相互に連結すればよい。更に、微量精製のためには、目的化合物と特異的に結合する物質、或いはその他通常の各種クロマトグラフィに用いられる物質を固定化することにより、異なったタイプのクロマトグラフィが作製できる。この時、固定化される構造体の形状も目的に応じ適宜選択できる。ある場合には、流路全体に固定したり、或いはエレクトロスプレイ・デポジションの条件を変えることにより多孔性を持たせることも可能である。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明によるマイクロチップは、生体高分子をスポット状またはストリップ状に固定させた反応場と、この反応場に連結され、反応場へ試料を供給する供給流路と、前記反応場と連結し、反応場の少なくとも一部を通過した試料を回収する回収流路と、を有する反応系を形成したブロックを具えることを特徴とするものである。本構成によれば、微量な生体高分子及び試料を用いて、生体高分子と試料との結合の検出をマイクロチップ上で行ったり、結合した化合物を回収しその同定を行うことができる。

【0013】また、本発明によるマイクロチップは、前記ブロックを、平坦な表面を互いに接合させた第1及び第2の基板を以って構成し、前記反応場、供給流路及び回収流路をこれらの基板の接合面に形成し、前記供給流路および回収流路を外部へ連通させる供給用開口及び回収用開口を形成したことを特徴とするものである。本構成によれば、例えば、微細流路となる凹部を加工した第2プレートと、生体高分子を固定させた第1の基板とを密着させるという簡便な製造工程でマイクロチップを容易に作製できる。

【0014】

請求項1または2に記載のマイクロチップにおいて、前記生体高分子の固定が、エレクトロスプレイ・デポジション法によって行われることを特徴とするものである。エレクトロスプレイ・デポジション法によれば、生体高分子の生物学的機能を損なわずにスポットを作製することができる。

【0015】また、本発明によるマイクロチップは、前記の供給流路及び回収流路は、2次元的または3次元的に形成されていることを特徴とするものである。本構成によれば、3次元的に流路を構成することにより個別の生体高分子スポットにて反応をした液体を個別に回収する事も可能である。また、1入力多出力、多入力1出力、多入力多出力という反応系を容易に作製することができる。即ち、スポット（反応場）に2次元的（平面）に試料を供給する場合はスポットの配置に余裕があれば対応できるが、平面にアレイ状に密に配置されたスポットには、各流路を設ける場所が不足することとなる。そこで、3次元的（立体）に、例えば第1の基板や第2の基板に貫通部を設けて、上方或いは下方から試料を供給したり反応物を回収したりするようにすれば、密なスポット配置であっても容易に各流路を配置することができるようになる。

【0016】また、本発明によるマイクロチップは、前記供給流路または供給用開口が、前記試料の供給及び流量を制御する供給手段を具え、前記回収流路または回収用開口が、前記反応場を通過した試料を回収する回収手段を具える、ことを特徴とするものである。本構成の制御手段によれば、反応の特性により、試料の流量を調節できる。また、回収手段によって、反応物を容易に回収できる。

【0017】また、本発明によるマイクロチップは、前記反応系が、前記供給用開口側では1つになっており、前記反応場側で分岐される供給流路と、この分岐された供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有する反応場と、これらの経路の各々に1つずつ連結される複数の回収流路と、これらの回収流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の回収用開口と、を有することを特徴とするものである。

【0018】また、本発明によるマイクロチップは、前記反応系が、前記供給用開口側では1つになっており、前記反応場側で分岐される供給流路と、この分岐された供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有する反応場と、前記反応場側で分岐しており、これらの経路の各々に1つずつ連結され、回収用開口側で1つに結合されているの回収流路と、を有することを特徴とするものである。

【0019】また、本発明によるマイクロチップは、前記反応系が、複数の供給流路と、これらの供給流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の供給用開口と、前記供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有

する反応場と、これらの経路の各々に1つずつ連結される複数の回収流路と、これらの回収流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の回収用開口と、を有することを特徴とするものである。

【0020】また、本発明によるマイクロチップは、前記反応系が、複数の供給流路と、これらの供給流路の各々を1つずつ外部と連通させる複数の供給用開口と、前記供給流路の各々に1つずつ連結される複数の経路を有する反応場と、前記反応場側で分岐しており、これらの経路の各々に1つずつ連結され、回収用開口側で1つに結合されているの回収流路と、を有することを特徴とするものである。

【0021】上述したように、1入力多出力、1入力多反応経路1出力、多入力1出力、多入力多出力のように多様な反応系を構成すれば、多様なスポットの配列や所望の反応に柔軟に対応可能となる。例えば、1入力多出力とすれば、各スポット毎に個別に反応物を回収することができるようになる。また、多入力多出力とすれば、1回の操作で多種類の試料を供給して、多数の反応経路を有する反応系を構成でき、各試料ごとに反応物を回収できる。

【0022】また、本発明においては、生体高分子の固定場所は任意である。例えば、第1の基板の表面にスポット状に固定させることもできる。或いは、反応場の内壁に全体に固定させることもでき、このような構成によれば、生体高分子と試料との接触面積を大きくなり、反応効率を高めることができる。

【0023】また、本発明によるマイクロチップは、前記反応系を 1 cm^2 に10ヶ以上、100ヶ以上、或いは1000ヶ以上含む事を特徴とするものである。本構成によれば、反応系がマイクロ化されるため、微量サンプルで反応系を構成でき、また、1つのチップの小さな領域上で1回の操作で、何段階もの反応を行うことができるようになる。

【0024】

【発明の実施の形態】以下、添付の図面に基づき本発明の実施態様を詳細に説明する。本発明によるマイクロチップは、たんぱく質などの生体高分子材料あるいは有機高分子材料をエレクトロスプレイ・デポジション法により固定化したスポット、それを支持する基板部分、さらにそこへ液体を供給する微細流路部分、及び反応物を回収する微細流路部分より構成される。

【0025】図1は、本発明によるマイクロチップの分解図であり、マイクロチップの基本的な構成例を示すものである。図中の基板1はプラスチック(PMMA、ポリカーボネート、ポリエチレン、フッ素系樹脂など)、ガラス(石英ガラス、光学ガラスなど)、セラミック(酸化アルミニウム、酸化ジルコニア、窒化珪素、窒化アルミニウムなど)、あるいは金属により構成される。電気絶縁性が良好な基板の場合は表面に導電性の薄

膜(金、プラチナ、ITOなど)を付与することも可能である。

【0026】この第1の基板1(ガラス或いはプラスチック製)上にエレクトロスプレー・デポジション(ESD)法により生体高分子のスポット2をアレイ状に形成する。これらのスポット2はAnal.Chem. 71のページ3110~3117(1999年)に公開されているマイクロアレイ作製の手法に従いESD法により形成され、その後架橋剤(グルタルアルデヒドなど)による処理によって固定化される。スポットを形成する高分子の材料としては、各種たんぱく質(酵素、抗体、膜蛋白など)、有機高分子材料(アクリル樹脂、セルロース、イオン交換樹脂、エポキシ樹脂)、色素、など架橋剤により重合させて固定化することが可能な機能性材料ならほとんどのものが使用可能である。

【0027】第2の基板3の片面には凹部4を設けてあり、第1の基板1のスポット2形成側と第2の基板3の凹部4側とを接合させることにより、閉じた微細流路及び反応場を形成し、反応すべき液体が適切に供給されるようになる。第2の基板3の凹部4の端部にはそれぞれ貫通部を設けてあり、それぞれ供給用開口5と回収用開口6として使用する。なお、供給用開口5から流入した液体は、微細流路に流れ、この流路は枝別れしており、液体がすべてのスポット部分へ並列的に均等に流れ、スポット部分を通過した後、最終的には1つの流路として集束し、回収用開口6から排出するように設計されている。即ち、1入力多出力の反応系を形成するものである。

【0028】次に、高分子スポットを固定させた基板1の構造について詳細に説明する。図2は、基板1上に形成された生体高分子のスポット2の構成を示したものである。スポット2は直径10~数100ミクロン程度の大きさに形成され、その厚さは1~50ミクロン程度である。それぞれのスポットの間隔はその直径の1~10倍程度となっている。スポットの個数は数個から数万個程度までの範囲で可能でありそれぞれのスポットがすべて異なる生体高分子あるいは有機高分子から構成されても良いし、各列ごとに同じ種類の高分子を固定することも可能である。もちろん、すべてのスポットを同じ高分子で構成することも可能である。図ではスポットの形状は円形となっているが、長方形、正方形その他の形状のスポットを形成することも可能である。

【0029】次に、微細流路を形成させる凹部4を設けた第2の基板3の構造について詳細に説明する。図3は、1入力1出力を持つ微細流路の模式図である。反応液は供給用開口5に接続されたポンプ、シリンジあるいはピペットによって注入され、流体分配回路7にて均等に分配され各反応流路(反応場)8に流入する。反応流路8は、生体高分子スポット(図示せず)が配置されるように形成されており、生体高分子と流体との反応によ

り目的物質の捕捉、反応、分析、検出が行われる。反応流路8を出た液体は集合回路9を通り回収用開口6へと導かれる。回収用開口6に接続されたチューブあるいはポンプにより液体が排出・回収される。

【0030】図4は、第1の基板1に第2の基板3を装着したマイクロチップの断面構造を示すものである。基板1上にエレクトロスプレー法により固定化された生体高分子スポット2はそれぞれ第1の基板1と第2の基板3の凹部4とにより形成される微細流路構造体の溝によって隔てられており、スポット2上を液体が流れようになっている。

【0031】次に、微細流路構造体の作製方法、即ち第2の基板3上に凹部4を作製する方法を説明する。第2の基板3は、プラスチック（PMMA、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレンなど）、ガラス（光学ガラス、石英ガラス、サファイアガラスなど）、セラミックス（アルミナ、ジルコニア、窒化珪素など）あるいは金属材料により構成される。微細溝状の凹部4を直接形成する方法としては、微細切削工具（エンドミル、バイトなど）により切削加工にて溝部分を削り取り形成する方法、フォトレジストによるマスクを形成し化学的エッティングによって形成する方法、フォトレジストによってマスクを形成し、アブレイシブジェットによって形成する方法、放電加工により凹部4を形成する方法などが可能である。また、量産性を高める方法としては、前記の直接微細溝を形成する手法を用いて型を形成し、これを用いてプラスチックによる射出成形を行う方法、セラミックスあるいは金属スラリーを射出成形しその後焼成する方法などが可能である。また、型材料としてタンゲステンカーバイドなどの高融点材料を使用することでガラス材料を高温にてプレスマールドし凹部4を形成することも可能である。

【0032】次に、第1の基板1と微細流路構造体である第2の基板3の接合について説明する。微細流路構造体である第2の基板3と生体高分子スポットを支持する第1の基板1との接合は、接着剤等を薄く塗布して行うことが一般的であるが、これ以外にも両者の平面度をきわめて高くすることにより接着剤を使用せずに接合する方法（オプティカルコンタクト法）、化学的に表面を活性化して接合する方法、温度を上昇させて接合する方法（拡散接合法など）、超音波振動を加えて接合する方法、界面にレーザー光などのエネルギービームを収束させて行う方法などにより接合しても良い。

【0033】図5は、1入力多出力（及び並列反応場）の微細流路の模式図である。反応流体は注入口10よりポンプなどにより注入され流体分配流路部11により均等に分配され反応流路12に流入する。流入した液体は反応流路12内に存在する生体高分子チップ上を通過し、回収流路13を通りそれぞれ独立した回収口14へ到達する。それぞれの回収用開口14から、ポンプある

いはピペットなどにより反応後の液体を回収する。

【0034】図6は、逐次反応系の微細流路の模式図である。供給用開口10から試料となる液体を注入し、流路の途中に複数個の高分子スポットが配置されており微細流路により液体がこれらのスポット上（即ち反応流路12）を順次通過し、回収用開口14より回収される。この場合高分子スポットは必ずしも円形である必要はなく、図のように長方形とする事で大きな反応面積を得ることができる。反応液は注入口10よりポンプあるいはピペットにより供給され、反応流路12を通り排出口14より回収される。反応流路12を形成する流路を図6のように蛇行させることで狭い面積のシステム上で多数のスポットと効率よく反応させることが可能である。

【0035】図7は、エレクトロスプレー法で固定化された高分子スポットにより形成されたマイクロカラムの模式図及びA-A'断面図である。これは、図1に示したマイクロチップシステムと同様に微細流路を構成するが、第1の基板15自体に微細流路となる凹部16を形成させてあり、反応面積を広くするため、エレクトロスプレー法により微細流路内に高分子の皮膜17を形成している。そして、この第1の基板15に平坦な第2の基板18を重ね合わせることにより、微細流路を形成させたものである。さらに、第1の基板15の凹部16部分は壁が傾斜しておりエレクトロスプレーにより高分子皮膜が付着しやすくなっている。これにより流路内で液体が高分子皮膜と接触する面積を増大させることができ。さらに、反応流路19は微細流路が網目状に配置されており反応面積をきわめて大きくとることが可能となっている。高分子材料としては抗体やprotein-Aなどのアフニティクロマトグラフに使われる特異的吸着能を持つたんぱく質、有機高分子材料が使用可能である。反応部の網目状構造は図示以外にも様々なパターンが使用可能である。このように図7では高分子皮膜を固定化した凹部16を持つ第1の基板15と、高分子スポットを持たない平坦な第2の基板18とを接合しているが、この高分子皮膜を固定化した凹部16を持つ基板15同士を接合する事で反応面積をより大きくすることも可能である。

【0036】3次元的に流路を構成することにより個別の生体高分子スポットにて反応をした液体を個別に回収する事も可能である。図8は、基板を含めて5層構造からなる3次元流路を持つマイクロチップシステムの構成例を示すものである。基板である第1層21、第2層22、第3層23、第4層24、第5層25を順次重ねたものである。第1層21には、生体高分子のスポット21Aを固定してある。第2層22は、各スポットに対応する位置に貫通部が設けてあり、この部分が反応流路（場）22Aとして機能する。反応流体は第5層25の左方の流入口25Aより流入し、第4層24の分配流路24Aを通して各高分子スポット上方の第3層23の流

体供給用微細穴23Aに達する。その後第2層22の反応流路22Aに流入し第1層21に形成された高分子スポット21Aの上方を通過し反応が行われる。反応のおわった液体は再び第3層23の反応物回収用微細穴および第4層24の反応物回収用微細穴24Bを通り、第5層25の回収口25Bに到達する。回収口25Bで液体はピペットあるいはポンプにより個別に回収される。

【0037】なお、上記の実施態様で挙げた実施例は例示に過ぎず、本発明の範囲には、幾多の変形、変更例が含まれることに留意されたい。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明によるマイクロチップの分解図である。

【図2】 基板1上に形成された生体高分子のスポット2の構成を示す図である。

【図3】 1入力1出力を持つ微細流路の模式図である。

【図4】 基板1にプレート3を装着したマイクロチップの断面構造を示す図である。

【図5】 1入力多出力の微細流路の模式図である。

【図6】 逐次反応系の微細流路の模式図である。

【図7】 エレクトロスプレー法で固定化された高分子スポットにより形成されたマイクロカラムの模式図及びA-A'断面図である。

【図8】 基板も含め5層構造からなる3次元流路を持つマイクロチップシステムの構成例を示す図である。

【符号の説明】

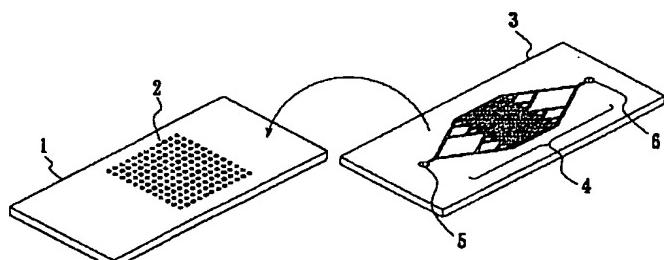
1 第1の基板

2 スポット

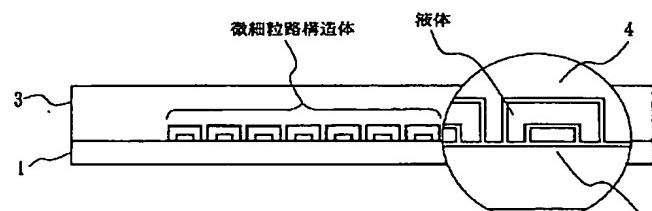
3 第2の基板

- 4 凹部
- 5 供給用開口
- 6 回収用開口
- 7 流体分配流路
- 8 反応流路（反応場）
- 9 集合流路
- 10 供給用開口
- 11 流体分配流路部
- 12 反応流路
- 13 回収流路
- 14 回収用開口
- 15 第1の基板
- 16 凹部16
- 17 高分子の皮膜
- 18 第2の基板
- 19 反応流路
- 21 第1層
- 21A スポット
- 22 第2層
- 22A 反応流路（場）
- 23 第3層
- 23A 流体供給用微細穴
- 23B 反応物回収用微細穴
- 24 第4層
- 24A 分配流路
- 24B 反応物回収用微細穴
- 25 第5層
- 25A 流入口
- 25B 回収口

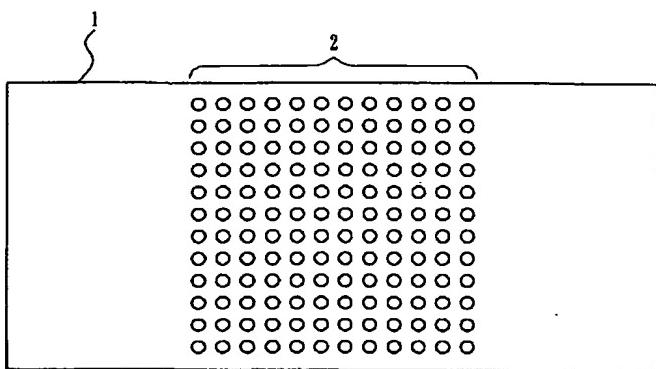
【図1】



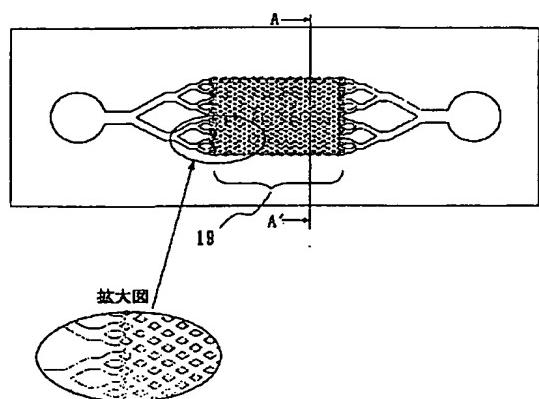
【図4】



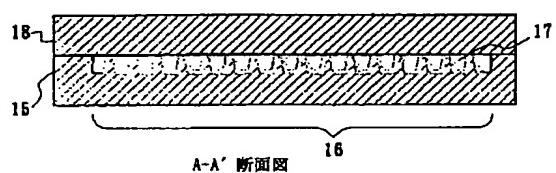
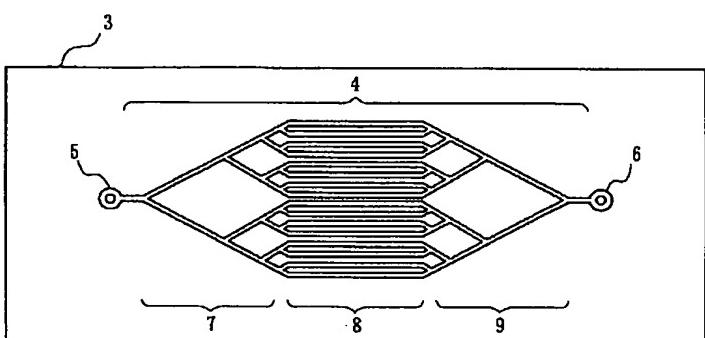
【図2】



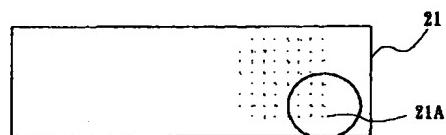
【図7】



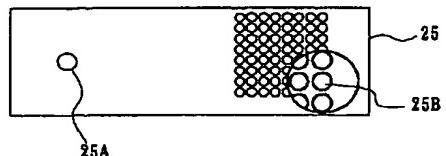
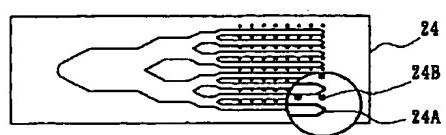
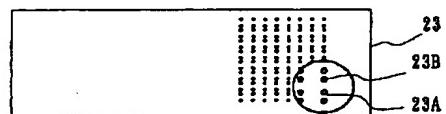
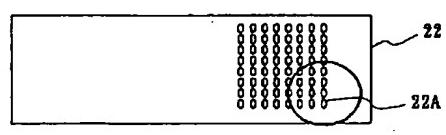
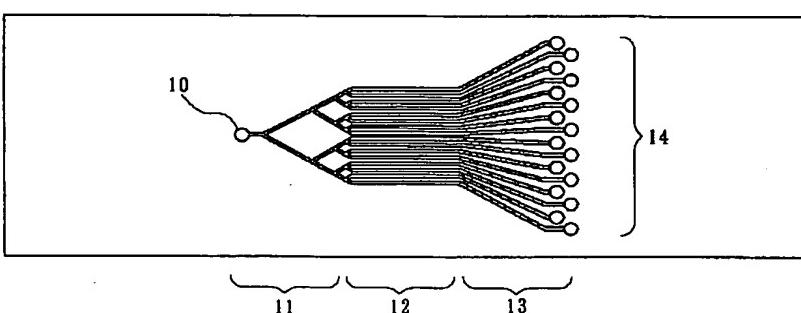
【図3】



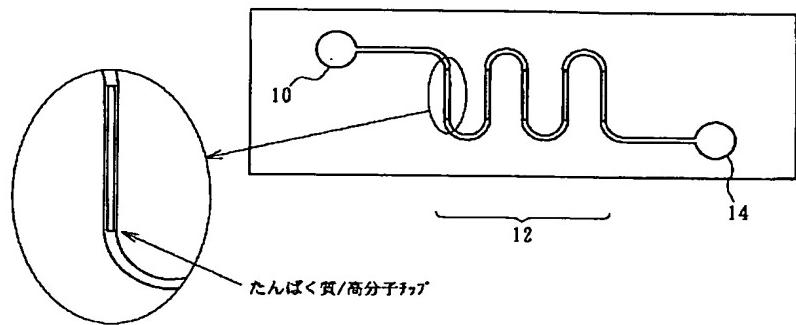
【図8】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 井上 浩三

東京都渋谷区広尾1-11-5-1403 工
ス・ティ・リサーチ株式会社内

Fターム(参考) 2G058 AA09 DA07